

치주 조직 재생과 캐리어를 위한 다양한 합성골 이식재의 개발과 평가

김유경¹, 유 훈¹, 임현창¹, 이종석¹, 정의원¹, 이용근², 최성호¹¹연세대학교 치과대학 치주과학교실, 치주조직재생연구소, ²조선대학교 치과대학 노인구강질환제어연구센터

Development and Evaluation of Synthetic Bone Graft Materials for Periodontal Tissue Regeneration and Carriers

You-Kyoung Kim¹, Hoon You¹, Hyun-Chang Lim¹, Jung-Seok Lee¹, Ui-Won Jung¹, Yong-Keun Lee², Seong-Ho Choi¹¹Department of Periodontology, Research Institute for Periodontal Regeneration, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Korea²Research Center for Oral Disease Regulation of the Aged, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Korea

Abstract

Purpose: The aim of this study was to evaluate the enhanced biocompatibility and mechanical properties of various newly developed carriers and osteoconductivity of bone graft materials in several studies conducted at Department of Periodontology, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Korea.

Materials and Methods: Studies were performed divided into the following two different subjects. 1) Development and evaluation of mechanical strength, biocompatibility and drug release capacity of new carriers: gelatin-layered and multi-sized porous β -tricalcium phosphate (β -TCP), hollow hydroxyapatite spherical granules and porous calcium polyphosphate granules. 2) Evaluation of bone regeneration of various particulated bone graft materials: alloplast (demineralized bone matrix [DBM] gel), xenoplast (bovine bone), synthetic bone (hydroxyapatite, β -TCP, biphasic calcium phosphate [BCP]) and block bone graft materials: nano-hydroxyapatite block bone and bovine hydroxyapatite/collagen block.

Results: Gelatin-coated multi-sized porous β -TCP showed enhanced compressive strength and affected cell viability and differentiation. Penetrability of drugs can be controlled by change of structure and pore properties of hollow hydroxyapatite spherical granules. Pore size and porosity of porous calcium phosphate influenced the osteogenic differentiation and cell differentiation. Even though limited volume stability of DBM gel was observed, bone regeneration of various graft materials was not significantly different. In particular, superior new bone formation in BCP and large resorption of β -TCP was observed among various calcium phosphate materials (hydroxyapatite, β -TCP and BCP). Block bone graft materials had better stability and space-maintaining capacity in one wall intrabony defects.

Conclusion: With the potentials and limitations of the suggested list of studies, effective carriers and various bone graft materials can be used for better periodontal regeneration in aspect of enhanced osteogenic properties and further studies are required for proper selection and application of materials in various intrabony defects.

Key Words: biphasic calcium phosphate, block bone graft, carrier, hydroxyapatite, osteoconductivity, tissue engineering

Reprint requests: Seong-Ho Choi
Department of Periodontology, Yonsei University College of Dentistry,
50, Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel: 82-2-2228-3189, Fax: 82-2-392-0398
E-mail: shchoi726@yuhs.ac
Received for publication: December 17, 2014
Accepted for publication: December 26, 2014

교신저자: 최성호
(120-752) 서울시 서대문구 연세로 50
연세대학교 치과대학 치주과학교실
Tel: 82-2-2228-3189, Fax: 82-2-392-0398
E-mail: shchoi726@yuhs.ac
원고접수일: 2014년 12월 17일
게재확정일: 2014년 12월 26일

This study was supported by a grant of the Korea Health Technology R&D Projects, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (101578).

Copyright © 2014. The Korean Academy of Oral & Maxillofacial Implantology

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I 서론

치주 질환에 이환되어 골소실이 발생한 환자
대한 치주 치료와 상실된 치아 수복을 위한 임
플란트 수술에서 골 결손부에 대한 재생 치
료의 필요성은 점차 높아지고 있다. 골 결손부를 수복하기
위한 재생 치료에서 가장 예시성 있게 사용되는 것은 골
이식술로서 골세포를 함유하고 있어 직접 골을 형성하거
나, 골 형성을 위한 비계로 작용하는 골 전도성을 가지고
있거나, 골을 유도하는 기질로써 골 유도성을 가지는 세
가지 기전으로 작용한다².

골 이식재는 기원에 따라 자가골, 동종골, 이종골, 합
성골로 나눌 수 있다³. 지금까지 가장 이상적인 골 이식
재로 생각되는 자가골은 골 형성능이 뛰어나고 면역 거
부 및 염증 반응이 없다는 장점에도 불구하고 채득할 수
있는 양이 한정되어 있고 흡수되는 양상을 가늠할 수 없
다는 단점이 있어 사용이 제한적이다⁴. 동종골과 이종골
은 이식 시 면역 거부 및 교차 감염의 가능성이 있어 이
와 같은 단점을 보완하기 위해 합성골 이식재에 대한 연
구가 활발하게 이루어지고 있다⁵. 또한 세포 독성을 감소
시키고 골 전도능을 향상시키기 위해 기존의 합성골과
함께 적용하기 위한 골유도성 물질의 연구도 다방면으로
이루어지고 있다.

이와 더불어 골세포의 재생을 촉진시키기 위한 조직 공
학(tissue engineering)에 관한 연구도 활발하게 진행되고
있다. 조직 공학이란 특정 조직의 재생을 촉진시키는 합
성 혹은 생물학적 기질 내에 다양한 성장 인자를 포함하
는 장치들을 실험실 내에서 제조하는 것을 의미한다⁶. 다
양한 다공 흡수성 기질 내에서 배양된 세포로부터 생산
된 조직을 조직 결손부에 이식하여 재생을 촉진하는 것
으로 자연적인 구조나 형태를 재건하거나 모방하고자 하

는 특성(biomimetics)을 가지며 ① 세포를 배양할 수 있
는 다공성 캐리어(carrier), ② 배양하고자 하는 특정 세
포 (cell), ③ 성장을 촉진하는 다양한 성장인자(growth
factor)가 필요하다⁷. 세포 및 성장 인자의 상호 교통을
증진시키기 위한 효과적인 캐리어의 개발은 현재 조직
공학에서 주요하게 연구되고 있는 분야이다. 효과적인
캐리어는 ① 생체 활성이 우수하고 ② 결손부 수복 및 합
성이 용이하며 ③ 체내 흡수될 수 있는 3차원 구조를 가
지고 ④ 골 유도 물질의 통로로서 기능하며 ⑤ 물리적으
로 충분한 강도가 있어야 하는데⁸, 체내 활성이 뛰어나고
흡수성이 좋을 경우 물리적 강도가 저하되는 상충점이
있다. 현재 체내 골조직과 유사한 구조를 가지며 강도가
우수한 hydroxyapatite (HA)가 캐리어로서 주로 사용되
고 있으며 상기 상충점을 보완, 개선시킨 효과적인 캐리
어의 개발이 중요하다.

본 연구팀에서는 치주조직의 재생을 극대화하기 위해
골 이식 시 고려될 수 있는 두 가지 주제(새로운 형태의
캐리어 개발을 통한 골전도능 향상도 평가와 HA,
 β -tricalcium phosphate [β -TCP], biphasic calcium
phosphate [BCP] 등의 다양한 합성골 이식재의 골 재생
능 평가)에 대해 연구하였다. 따라서 본 연구에서는 새로
운 캐리어의 개발과 다양한 합성골 이식재의 골 재생능
평가를 통한 치주조직 재생에 대하여 연세대학교 치과대
학 치주과학교실에서 시행한 일련의 연구들을 기반으로
그 결과 및 효과를 보고하고자 한다(Table 1)^{4,9-15}.

II 연구재료 및 방법

1. 새로운 형태의 스캐폴드 개발

조직 공학에서 효과적인 세포의 부착과 증식, 분화 및
세포 외기질의 형성을 도모하기 위한 스캐폴드의 제조는

Table 1. Study designs of the included studies

Author	Purpose	Study groups	Study model	Evaluation method	Healing period (wk)
Zhang et al. ⁹ (2012)	To compare bone regeneration between different bone graft materials	Control DBM gel Bovine bone Hydroxyapatite	Rabbit calvaria	Histological & histomorphometric	2/8
Hwang et al. ¹⁰ (2012)	To compare bone regeneration between different synthetic materials	Control β -TCP Hydroxyapatite BCP	Rabbit calvaria	Histological & histomorphometric analysis	4/8
Yang et al. ⁴ (2014)	To compare bone regeneration according to different ratio of β -TCP in BCP	Control Pure β -TCP HA/ β -TCP=60 : 40 HA/ β -TCP=20 : 80	Rabbit calvaria	Histological & histomorphometric analysis	2/8
Lee et al. ¹⁴ (2012)	To investigate the effect of nano-hydroxyapatite block scaffold on one-wall periodontal intrabony defects	Control Nano-hydroxyapatite block	Canine three-wall defects	Histological & histomorphometric analysis	8
Jung et al. ¹⁵ (2011)	To investigate the effect of a bovine hydroxyapatite/collagen block on one-wall periodontal intrabony defects	Control Bovine hydroxyapatite/collagen block	Rabbit sinus	Statistical analysis SEM Histological & histomorphometric analysis	12
Kim et al. ¹¹ (2012)	To discuss gelatin-layered and multi-sized porous β -TCP as bone grafts and drug carriers	Uni-sized porosity Gelatin-coated uni-sized porosity Multi-sized porosity Gelatin-coated multi-sized porosity		SEM XRD FTIR	8
Hong et al. ¹² (2012)	To discuss hollow hydroxyapatite spherical granules for bone regeneration and carrier	H1 (0.50 HA ratio) H2 (0.33 HA ratio) H3 (0.25 HA ratio)		SEM XRD FTIR	
Hong et al. ¹³ (2013)	To characterize porous calcium poly phosphate granules for bone regeneration	NP P2 P3 P4 P6		SEM XRD FTIR	

Group code according to porogen size (diameter, μm); NP: no porogen, P2: 212~300, P3: 300~425, P4: 425~600, P6: 600~850.

DBM: demineralized bone matrix, β -TCP: β -tricalcium phosphate, BCP: biphasic calcium phosphate, HA: hydroxyapatite, SEM: scanning electron microscopy, XRD: X-ray diffraction, FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy.

그 중요성이 더욱 부각되고 있다. 스캐폴드는 생체 친화적이고 생체 흡수성 및 구조적 안정성이 있어야 하는데 HA, β -TCP, calcium phosphate (CaP) 등은 이러한 성질을 가진 스캐폴드로서 널리 사용되고 있다¹¹. 기존의 스캐폴드보다 생물학적 성질을 증대시키고 기계적 안정성을 향상시키기 위한 연구가 진행되었다.

젤라틴은 콜라겐의 triple-helix 구조를 열 변성 및 물리, 화학적으로 와해시켜 만든 물질로서 항원성이 낮고 체내 흡수성이 우수하며 물리, 화학적 조작이 용이하고 가격이 저렴할 뿐 아니라 획득이 쉬운 장점이 있다. 젤라틴을 코팅한 3차원 스캐폴드의 생물학적, 기계적 성질 향상성을 알아보기 위한 연구가 시행되었다¹¹.

HA는 생체 친화성이 우수한 재료로 골 재생을 위한 캐리어로 널리 쓰이고 있다. 결손부 골이식을 위해서는 균일한 형태로 제작되어야 하며¹⁶ 골 전도성 및 골 유도성을 높이기 위해 다양한 성장 인자의 전달 통로로서 기능을 하는 것도 중요하다¹⁷. 균일한 형태의 hollow HA granule을 제작하여 약물 침투 및 방출 기능을 평가하고 결손부 충전재로서의 기능 및 성장 인자 전달 통로로서의 기능 향상 여부에 대한 연구 또한 진행되었다¹².

캐리어의 기공은 세포 부착, 증식, 물질의 이동에 영향을 미치며 기공의 크기를 변화시켜 신생골의 성장, 세포 이동 및 증식, 빈 공간 내에서의 기질의 침착 등을 조절할 수 있으며 기공간의 연결성은 혈관 형성 및 세포 분화, 이동에 영향을 미칠 수 있다¹³. 경조직 재생 시 다공성 calcium phosphate granules (CPPGs)의 효과를 증진시키기 위해 기공의 크기와 기공 간 연결성에 대한 연구가 진행되었다¹³.

1) 재료 제작

① 젤라틴 코팅된 다양한 크기의 다공성 β -tricalcium phosphate 스캐폴드

Nano β -TCP powder (OssGen Co., Daegu, Korea)를

증류수에 분산시켜 만든 β -TCP slurry에 천연 부가물 (5% polyvinyl alcohol, 1% methyl cellulose, 5% ammonium polyacrylate dispersant, 5% N,N-dimethylformamide drying agent)을 첨가한 뒤 소결하여 스캐폴드 구조를 형성하여 $5 \times 5 \times 5$ mm 크기로 만들었다. Bovine bone (BB)으로부터 추출한 3% 젤라틴 powder는 45°C 의 증류수에 희석한 뒤 0.2% glutaraldehyde로 교차 구조를 형성한 뒤 진공상태에서 β -TCP에 코팅하였다.

② Hollow hydroxyapatite spherical granule

2.0 wt% of alginic acid (Aldrich, USA)와 1.0 wt% of calcium chloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 혼합하여 alginate beads를 제조한 뒤 증류수로 세척한 후 HA (OssGen Co.) slurry를 코팅하였다. HA slurry의 농도에 따라 ① H1=0.50, ② H2 0.33, ③ H3=0.25 (powder/liquid, g/ml)로 분류하였으며 이를 동결 건조하는 과정으로 beads 안의 수분과 유기물을 승화시켜 방사형 기공 통로를 형성하였다.

③ 다공성 calcium phosphate granule

무정형 CaP 입자는 CaCO_3 (Samchun Pure Chemical, Pyeongtaek, Korea), H_3PO_4 , MgO, ZnO (Duksan Pure Chemical, Ansan, Korea), CaF_2 (Junsei Chemical, Tokyo, Japan)를 사용하였으며 Ca : P의 비율을 0.6 : 1로 맞추어 제조하였다.

2) 평가 방법

① 젤라틴 스캐폴드의 기계적 성질 및 생물학적 성질의 평가

젤라틴 코팅된 β -TCP의 표면 구조는 field emission scanning electron microscopy (FE-SEM, S-800; Hitachi, Tokyo, Japan)으로 관찰하였고 기공의 크기 및 스캐폴드 구조의 두께는 micro-CT (Skyscan 1076; Skyscan Co., Antwerp, Belgium)로 관찰하였다. 압축강도는 universal testing machine (3366; Instron Co.,

Table 2. Classification of group according to porogen size and porosity

	Group code				
	NP	P2	P3	P4	P6
Porogen size (diameter, μm)	No porogen	212~300	300~425	425~600	600~850
Porosity (%)	—	48,706	43,899	41,379	33,327

The porosity grows with porogen size declination.

You-Kyoung Kim et al. : Development and Evaluation of Synthetic Bone Graft Materials for Periodontal Tissue Regeneration and Carriers. Implantology 2014

Ltd., Norwood, MA, USA)으로 $S=F/A$ (S : 압축강도, F : 최대 부하력, A : 부하력에 수직한 방향에서의 스캐폴드의 표면적)로 구하였다.

생물학적 성질은 세포 증식력과 분화력으로 평가하였다. Mouse osteoblast cell인 MC3T3-E1 세포(ATCC, Rockville, MD, USA)가 in vitro 실험에서 사용되었고 세포 활성도 평가는 cell counting kit-8 (CCK-8; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 사용하여 평가하였다. 세포 분화력은 Sensolyte pNPP ALP assay kit (Ananspec Inc., Fremont, CA, USA)를 사용하여 alkaline phosphate (ALP) 수치를 측정하였다.

② Hollow hydroxyapatite spherical granules

구조적 특성은 SEM (S-3000H; Hitachi), X-ray diffraction (XRD, Ultima IV; Rigaku, Japan), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR, Avatar 360; Thermo Nicolet, USA)를 이용하여 분석하였다. SEM으로 granule의 구조를, XRD와 FTIR을 이용하여 granule의 특성을 관찰하였다.

③ 다공성 calcium phosphate granule

입자의 특성은 상기 언급된 XRD와 FTIR을 이용하여 분석하였고 입자의 크기는 dynamic light scattering technique (DLS, Zetasizer Nano ZS90; Malvern, UK)로 분석하였다. Paraffin beads는 melted Paraplast (Leica Microsystems, Germany)와 1% polyvinyl alcohol (PVA, Sigma-Aldrich)를 혼합하여 제조하였다. CPPGs의 기공

률은 mercury porosimeter (Autopore IV 9500; Micromeritics, USA)로 분석하였고 형태는 SEM (JEM-2100F; JEOL, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. Porogen 크기에 따라 Table 2에서와 같이 5군으로 나누었다.

Calcium ion 방출 시험: 각 군의 calcium ion은 21일 동안 매일 세척되면서 calcium ion selective electrode (Calcium ISE; Thermo Scientific, USA)를 이용하여 방출률을 측정하였다.

3D culturing of pre-osteoblast MC3T3-E1: 24개의 배지에 MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts (ATCC)가 37°C, 5% CO_2 조건에서 보관된 후 LIVE-DEAD Viability kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 초기 부착 세포를 관찰하고 ZEN software programme (Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 세포 영상을 획득하였다.

세포 증식과 분화 측정: 세포 증식 검사에서 입자들은 PBS (Gibco, USA)로 3번 세척한 후 배양된 MC3T3-E1과 함께 0.1% Triton X-100 solution (Sigma, Switzerland)으로 용해되었고 암실에서 5분간 배양된 후 microplate reader (POLARstar OPTIMA Micro Plate Reader; BMG Labtech, Offenburg, Germany)를 이용하여 분석하였다. 세포 분화 검사에서 세포 배양 2주 후의 입자들은 상기 ①의 ALP 검사를 통해 분석되었다.

2. 다양한 이식재의 골 재생능 평가

1) 재료

① 탈회동종골, 탈회우골 및 합성 hydroxyapatite

골 이식을 위한 이식재로서 자가골은 채득 및 사용의 한계가 있어 동종골, 이종골, 합성골이 개발되어 사용되고 있다. 동종골은 동결건조 동종골과 탈회동결건조 동종골로 나눌 수 있는데 탈회골 기질인 demineralized bone matrix (DBM)에는 저농도의 골형성 단백질(bone morphogenic protein, BMP)과 같은 성장인자가 포함되어 있어 이들에 의해 골 형성이 이루어진다^{18,19}. 이종골은 공급량의 제한이 적고 인체 해면골과 구조가 유사하다는 장점이 있다. 그 중 BB는 인체의 HA와 유사한 구조를 가지고 있고 높은 형태 안정성이 있어 대표적으로 사용되고 있다²⁰. 대표적인 합성골 이식재인 HA는 생체적 합성이 우수하고 골 형성 지지체로 사용할 수 있는 장점이 있어 널리 사용되고 있으며 본 연구에서는 각각의 재료를 평가하였다²¹.

② Tricalcium phosphate 및 biphasic calcium phosphate

CaP 중 TCP는 다양한 형태의 골 결손부에서 골 재생을 촉진시키는 재료로 가장 많이 쓰이는 재료 중 하나이지만 흡수 속도가 빨라 공간 및 부피 유지에 한계가 있다⁴. 따라서 골전도능은 낮으나 공간 유지능이 우수한 HA와 조합하여 만든 BCP의 골 전도능 및 공간 유지능을 평가하였다.

③ 블록형 골 이식재

파괴된 치주조직의 형태는 다양하기 때문에 1벽성 골 결손부와 같이 구조적으로 치주조직의 재생이 어려운 경우에서 입자형 골 이식재만 사용할 경우 골 재생보다 점합상피의 증식이 먼저 일어나거나²² 이식재가 이동하여 형태 안정성이 떨어지므로 조직 재생 및 치유가 지연된다¹⁴. 따라서 computed tomography (CT) 영상과 컴퓨터

기반 이식재 디자인 기술 및 제조 과정을 통해 골 결손부에 맞는 맞춤형 블록형 골이식재(customized block bone)¹⁴ 및 흡수성 차단막의 성분인 콜라겐 합성 bovine HA/collagen (BHC) 블록형 골 이식재를 제조하여¹⁵ 이식재의 형태 안정성 및 치유 촉진을 유도하는 연구를 시행하였다.

2) 실험 동물

① 토끼 두개골 결손부

탈회동종골, 탈회우골, HA, TCP 및 BCP의 골 재생능을 평가하기 위해 2.8~3.2 kg New Zealand White Rabbit을 사용하였으며 실험 동물의 선정과 관리, 외과적 처치 및 준비는 연세대학교 의과대학 임상연구센터의 지침을 따라 시행되었다.

② 개의 1벽성 골 결손부

1벽성 골 결손부에서의 블록형 골 이식재의 골 재생능을 평가하기 위해 9~13 kg, 15개월된 비글견을 사용하였으며 실험 동물의 선정과 관리, 외과적 처치 및 준비는 연세대학교 의과대학 임상연구센터의 지침을 따라 시행되었다.

3) 실험 방법 및 평가 방법

① 토끼 두개골 결손부에서의 탈회동종골, 탈회우골, hydroxyapatite 및 tricalcium phosphate의 골 재생능 평가

외과적 처치 및 이식재의 적용: 토끼 두개골 결손부 모델에서 각각의 2.8~3.2 kg New Zealand White Rabbit은 Ketamine hydrochloride (Ketalar; Yuhan Co., Seoul, Korea)와 xylazine (Rumpun; Bayer Korea Ltd., Seoul, Korea)으로 전신마취시켰다. 수술 부위를 povidone iodine으로 소독하고 2% lidocaine (Lidocaine HCl; Huons, Seoul, Korea)으로 침윤마취하였다. 전두골 전방부에서 후방부까지 중앙 부위를 따라 절개하고, 골막을

포함하여 판막을 거상해 두개골을 노출시켰다. 노출된 두개골 부위에 8 mm trephine bur를 이용하여 뇌경막이 손상되지 않도록 주의하면서 직경 8 mm의 원형 결손부를 4개 형성하였다. 형성된 결손부에 앞서 언급한 실험군에 따라 실험재료를 적용하였고, 골막과 피하조직은 흡수성 봉합사로, 두피는 4-0 Monosyn (B-Braun Aesculap Inc., USA)으로 봉합하였다. 수술 후 1주일간 항생제 gentamicin (5 mg/kg)을 근육주사하였고, 수술 1주일 후에 발사하였다.

탈회동종골, 탈회우골, HA의 골 재생력 평가에 사용된 재료는 DBM gel (Bongener; CG Bio Co., Ltd., Seongnam, Korea)과 BB (0.25~1.0 mm particle, Bio-Oss; Geistlich-pharma, Wolhusen, Switzerland), HA (Bongros-HA; Bio- α Co., Ltd., Seongnam, Korea)를 3개의 결손부에 무작위로 이식하고 나머지 결손부는 대조군으로서, 혈병으로 채워졌다. 각각 7마리씩 2주, 8주군으로 나누어 희생하였다.

다른 비율의 TCP 함량에 따른 BCP의 골 재생능을 평가하기 위해 10마리의 β -TCP (Cerasorb M; Curasan, Kleinostheim, Germany), BCP 60/40 (MBCP, HA : β -TCP=60 : 40; Bionatlante, Vigneux de Bretagne, France), BCP 20/80 (MBCP+, HA : β -TCP=20 : 80; Bionatlante)가 3개의 결손부에 무작위로 이식되었고 1개의 결손부는 대조군으로서 혈병으로 채워진 후 5마리씩 2주, 8주 뒤에 희생되었다.

HA, TCP, BCP의 골 재생능을 평가하기 위해 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (99%; Sigma-Aldrich)와 $(\text{OC}_2\text{H}_5)_3\text{P}$ (97%; Sigma-Aldrich)가 CaP sol 제조의 전구체로 사용되었다. HA sol에서 Ca : P의 비율은 1.67 : 1이고 β -TCP에서 Ca : P의 비율은 1.5 : 1이며 BCP는 HA : β -TCP의 비율이 6 : 4로서 sol화된 전구체를 drying chemical control additive를 사용하여 블록 형태로 제조하여 3개의 골 결손부에 블록형 HA, β -TCP, BCP로 무작위 이식하

였다. 각 5마리씩 4주, 8주 뒤에 희생하였다.

평가 방법: 임상적으로 염증 소견 및 합병증, 특이사항 유무를 육안으로 관찰하고 표본채득 후 micro CT (SkyScan 1072; SkyScan Co.)로 골 형성 소견을 영상으로 관찰, 분석하였다. 수술 부위 절편을 채득하여 H&E로 염색하여 광학현미경(Olympus BX50; Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)을 사용하여 조직학적 관찰을 시행하였다. 또한 자동 영상분석 프로그램(Image-Pro Plus; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA)으로 ① 조직 증대면적(mm^2), ② 신생골 면적(mm^2), ③ 잔존이식재의 면적(mm^2)을 조직계측학적으로 관찰하였다. 각 군의 계측값은 PASW Statistics version 18.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA) 통계분석 시스템으로 처리하여 각 실험군 간의 유의차를 평가하였다. HA, TCP, BCP 블록골 시편의 조성은 XRD로 검사하였고 SEM (S-3000N; Hitachi)을 이용하여 이식재 표면 형태를 확인하였다.

② 개의 1벽성 골 결손부에서 맞춤형 nano-hydroxyapatite 블록골 및 콜라겐 합성 bovine hydroxyapatite 골 재생능 평가

n-HA 블록골의 제조: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (99%; Sigma-Aldrich)와 $(\text{OC}_2\text{H}_5)_3\text{P}$ (97%; Sigma-Aldrich)를 사용하였으며 Ca : P=1.67 : 1로 하여 950°C에서 건조하여 액상 HA를 제조한 후 HA slurry를 증류수에 분산시킨 후 다공성 스펀지에 주입하였다. 수축률 75%로 조절하여 Kanthal furnace에서 600°C, 2시간 열처리하는 과정을 2번 반복하여 강화된 블록형 골 이식재를 만든 후 low speed saw (Isomet; Buehler, Lake Bluff, IL, USA)를 이용하여 4×4×5 mm의 크기로 재단하였다.

외과적 처치와 이식재의 적용: 실험 ①에서 5마리 비골견의 하악 양측 제1, 3 소구치를 발치한 후 협설측 판막을 거상하고 제4소구치 근심부에 협설, 근원심, 깊이 4×4×5 mm 크기의 일벽성 결손부를 형성하였다. 제4소구치 치근면을 활택한 후 양측 결손부에서의 기준점이

되도록 치근면에 reference notch를 형성하고 한쪽 결손 부에만 nano-particle로 제조한 블록형 골이식재를 이식한 뒤 8주 후에 희생하여 골 재생 양상을 관찰하였다. 실험 ②에서는 같은 과정을 시행하였으며 $4 \times 4 \times 5$ mm의 BHC를 이식한 후 추가로 12주의 치유기간 후 희생하였다.

평가 방법: 실험 ①의 조직 시편은 micro-CT (μ CT, SkyScan 1072; SkyScan Co.) 및 Ondemand 3D software (CyberMed Inc., Seoul, Korea)로 영상 분석하는 한편 Masson's trichrome으로 염색한 후 microscopy (Rearch System Microscope BX51; Olympus Optical Co.) 및 컴퓨터 기반 영상 분석 시스템(Image-Pro Plus; Media Cybernetics)를 이용하여 조직학적, 조직계측학적 분석하였다. 평가 항목은 1) 수직적 높이: reference notch로부터 백악법랑경계(cemento enamel junction, CEJ)까지의 거리, 2) 상피조직 부착: CEJ로부터 치근 방향으로의 상피세포 증식거리, 3) 결합 조직 부착: 신생 백악질까지의 상피세포 증식거리, 4) 백악질 재생: 활택된 치근면의 기저에서부터 새로 형성된 백악질까지의 거리, 5) 골 재생 여부: 활택된 치근면의 기저부에서부터 신생골까지의 거리, 6) 광화된 조직: 활택된 치근면 기저부로부터 치근단 방향으로 형성된 광화조직까지의 거리 등이다. 실험 ②의 시편은 영상분석 없이 H&E 염색 후 ①과 동일한 방법으로 조직학적, 조직계측학적 계측을 시행하였고 상기 1)~5)까지의 항목을 측정하였다.

III 연구결과

1. 새로운 형태의 캐리어 개발을 통한 골 전도능 향상도 평가

1) 젤라틴 코팅된 β -tricalcium phosphate 스캐폴드의 기계적, 생물학적 특성

젤라틴 코팅된 β -TCP의 기공률 및 평균 두께는 코팅 전의 상태와 유사하였다. 그러나 고탄성을 가진 젤라틴 코팅 시 압축강도는 5배 가량 증가하였다. 생물학적 평가에서 기공의 크기는 세포 생존력에 영향을 미치지 않았으나 젤라틴 코팅 자체는 세포 생존력을 향상시켰다. 세포 분화력 평가에서 다양한 크기의 기공은 균일한 크기의 기공에서보다 ALP 활성이 높았고, 젤라틴 코팅 시 ALP 활성이 또한 증가하였다.

2) Hollow hydroxyapatite spherical granule에서의 경조직 재생능 및 약물 방출 효과

XRD pattern 그래프에서 raw HA의 peak와 H1, H2, H3의 peak는 모두 일치하였다. Alginate beads를 승화시킨 후 실험군과 alginate beads의 FTIR spectra를 비교하였을 때 peak는 일치하지 않았다. 약물 방출을 위한 투과성 평가에서 simulated body fluid (SBF)에 7일간 침전시킨 후의 결과 XRD pattern은 세 군에서 peak의 변화가 없었으나 FTIR spectra에서는 $1,650 \sim 1,300$ cm^{-1} 와 873 cm^{-1} 에서 새로운 peak가 나타났고 이는 carbonate ion이 형성되었음을 보여준다.

SBF에 HA granule을 침전시킨 후의 SEM을 통한 표면 관찰에서 1일 동안 침전시킨 후 세 군에서 모두 표면에 apatite crystal이 형성되었다. 그러나 H1, H2 내부에는 apatite crystal이 생성되지 않았다. 3일 후의 SEM을 통

한 관찰에서 H2는 SBF가 granule의 내부까지 침투하여 crystal을 형성하였으나 H1에는 미세 기공이 남아있었다.

3) 다공성 calcium phosphate granule

XRD pattern의 관찰에서 각 입자들은 crystalline phase가 나타나지 않았으며 FTIR spectra에서 1,500~700 cm⁻¹에서 peak가 나타나 P-O 또는 P-OH와 같은 인산기가 부착되어 있음이 관찰되었고 인산기의 양은 기공 구조가 형성될수록 감소하였다. SEM 분석에서 CPPG의 기공성은 porogen의 사이즈가 감소함에 따라 33.327%에서 48.706%로 증가하였다. 기공 크기와 기공성 모두 골 형성 분화와 세포 증식에 영향을 준다. 칼슘 이온 방출 검사에서 기공성이 증가할수록 칼슘이온 방출이 증가하고, 세포 활동에도 영향을 주었다.

2. 다양한 이식재의 골 재생능 평가

1) 탈회동종골, 탈회우골 및 합성 hydroxyapatite의 골 재생 비교

임상적으로 합병증이나 염증 소견은 발견되지 않았으

며 micro CT상 대조군과 DBM gel 이식군에서는 2주군보다 8주군에서 다소 증가된 방사선 불투과상이 보였다. BB 이식군과 HA 이식군에서는 2주, 8주 모두 고밀도 방사선 불투과상이 보였다.

조직학적으로 모든 이식재에서 2주군보다 8주군에서 신생골의 형성량이 증가하였으나 그 양이 현저하지 않고 대부분의 결손부는 신생골로 대체되지 않고 성긴 결합조직으로 채워졌다. HA 이식군에서는 골가교가 관찰되고 신생골과 이식재 간에 공간이 발견되었다. 골 결손부의 형태는 안정적으로 유지되었다.

조직계측학적으로 ① 조직증대면적은 2주보다 8주에서 감소하였으나 이식재를 이식한 군에서의 조직증대는 대조군보다 컸다. ② 신생골 면적은 대조군 외에는 8주에서 2주보다 더 많은 신생골이 생성되었으나 이식재간의 유의차는 없었다. ③ 잔존이식재의 면적은 순수 이식재의 양만을 측정하였고 BB와 HA 이식재 군에서는 흡수가 적었으나 DBM gel군에서는 남은 골이식재 양이 2주군에 비해 8주에서 현저히 감소하였다(Table 3).

Table 3. Total bone augmented area, new bone area and residual materials area of histometric results in various bone graft materials at 2 and 8 weeks of healing (mm²)

	2 Weeks of healing			8 Weeks of healing		
	Augmented area	New bone	Residual materials	Augmented area	New bone	Residual materials
Control	3.65±1.40	0.65±0.36		3.98±1.00	1.11±0.38	
DBM gel	30.35±4.68	0.77±0.41	7.62±1.12	9.88±3.16	1.48±0.56	1.33±0.44
BB	13.02±1.83	0.71±0.52	3.17±0.52	11.34±2.12	1.65±0.55	2.55±0.80
HA	16.76±2.54	1.21±0.42	3.91±0.58	14.48±1.37	2.22±0.78	3.27±0.34

Values are presented as mean±standard deviation.

Significant statistical difference compared to each group and healing periods is less than p<0.05.

DBM: demineralized bone matrix, BB: bovine bone, HA: hydroxyapatite.

You-Kyoung Kim et al. : Development and Evaluation of Synthetic Bone Graft Materials for Periodontal Tissue Regeneration and Carriers. *Implantology* 2014

2) Tricalcium phosphate 합성골 이식재의 골 재생능 평가

XRD pattern 그래프에서 BCP의 peak와 HA 및 β -TCP의 peak는 모두 일치하였고 세 가지 형태의 CaP ceramic 입자의 형태를 SEM으로 분석한 결과 β -TCP에서는 매끄러운 표면이 꺼져있는 양상이 관찰되었으나 BCP 군에서는 기공이 서로 연결되어 고도로 상호 연결되고 거친 표면 양상이 관찰되었다.

조직학적 분석에서 모든 군에서 8주군에서 2주군 또는 4주군보다 신생골 생성이 증가하였으나 BCP와 HA에서는 이식재 부위만이 아니라 입자 간 빈 공간에서도 골양세포가 나타나면서 현저한 골 재생이 관찰된 반면 β -TCP군에서는 이식재 주위를 성긴 결합조직이 둘러싸면 제한된 골 형성이 관찰되었다.

조직계측학적으로 ① 조직 증대 면적은 대조군에 비해 이식재 적용군에서는 모두 현저하게 증가하였다. ② 신생골의 면적은 8주군에서 2주군 또는 4주군보다 현저하게 증가하였으나 대조군을 제외한 이식재군 간에는 유의차가 없었다. ③ 잔존 이식재의 면적은 2주 후 결과에서 β -TCP는 현저하게 줄어들었으나 BCP와 HA군에서는 경미한 감소만 관찰되었고 ④ BCP의 비율에 따른 각 군 간

의 차지 면적에서는 2주, 8주 간에는 별다른 차이가 없었으나 80/20군과 60/40군 간의 차이는 두드러졌다. 추가적으로 연조직의 차지 면적은 이식재 적용군보다 대조군에서 현저하게 높았다(Table 4).

3) 1벽성 골 결손부에서 맞춤형 nano-hydroxyapatite 블록골 및 콜라겐 합성 bovine hydroxyapatite 적용 시의 골 재생능 평가

① 맞춤형 nano-hydroxyapatite 블록골 이식

조직학적 검사 결과 HA 블록골 이식군에서 대조군에서 공간 유지능이 우수하였지만, 신생골 형성은 거의 일어나지 않았다. 방사선학적 검사에서 대조군에서 골 재생량(0.85 ± 0.67 mm)에 비해 놓은 골 재생량(2.27 ± 0.38 mm)이 관찰되었다. 조직계측학적 검사에서 시행한 여러 결과에서는 대조군과 실험군 간의 유의미한 차이가 발견되지 않았다.

② 콜라겐 합성 bovine hydroxyapatite 이식

5마리의 실험 동물 중 2마리에서는 우수한 치주조직 재생 소견이 관찰되었다. 노출된 치근면을 따라 신생 백악질이 형성되었고 골 유착 없이 치주 인대 내로 혈관 및 샤프 섬유가 형성된 것이 관찰되었다. 또한 이식재 주변

Table 4. Total bone augmented area, new bone area and residual materials area of histometric results in various calcium phosphate materials at 4 and 8 weeks of healing (mm²)

	4 Weeks of healing			8 Weeks of healing		
	Augmented area	New bone	Residual materials	Augmented area	New bone	Residual materials
Control	10.78 \pm 2.54	3.99 \pm 1.54	NA	10.51 \pm 4.11	4.55 \pm 2.50	NA
HA	39.26 \pm 12.16	4.97 \pm 1.91	7.39 \pm 2.52	46.55 \pm 7.59	6.95 \pm 3.51	6.84 \pm 1.14
β -TCP	42.50 \pm 4.95	1.56 \pm 1.32	9.88 \pm 2.08	40.96 \pm 6.44	4.04 \pm 1.39	5.76 \pm 2.25
BCP	48.51 \pm 6.04	5.60 \pm 3.93	7.03 \pm 2.19	46.20 \pm 4.98	9.03 \pm 3.39	6.09 \pm 1.10

Values are presented as mean \pm standard deviation.

Significant statistical difference compared to each group and healing periods is less than $p < 0.05$.

HA: hydroxyapatite, β -TCP: β -tricalcium phosphate, BCP: biphasic calcium phosphate, NA: not available.

You-Kyoung Kim et al. : Development and Evaluation of Synthetic Bone Graft Materials for Periodontal Tissue Regeneration and Carriers. Implantology 2014

부로 신생골이 형성되는 양상이 관찰되었다. 반면, 나머지 3마리에서는 이식재가 이동하여 원래 이식 위치에는 적은 양의 이식재만 남아있었다. 섬유성 결합조직이 이동된 이식재 내부로 침투하여 들어가고 파골 세포 유사 세포들에 의한 이식재의 흡수 양상이 관찰되었다. 양호한 결과의 군에서는 그 외의 실험군에 비해 백악질 및 신생골의 형성이 두드러지고 상피 세포의 증식은 적어 실험군 내의 유의차가 컸다.

IV 총괄 및 고찰

파괴된 치주 조직이나 골 결손부를 재생시키기 위한 여러 연구들이 진행되어 왔다. 임상적으로 적합한 골 이식재를 찾기 위한 많은 동물 실험 및 임상 연구가 진행되고 있으나 임상 연구에서는 조직학적 및 조직계측학적 분석이 어려운 한계가 있어 본 연구에서는 동물 실험을 통해 골 이식재의 골 재생 능력과 부작용 유무를 검증하여 임상 적용에서의 객관적인 지표를 제시하고 보다 향상된 골 재생을 유도하기 위한 새로운 연구에 대한 평가를 시행하였다.

1. 새로운 형태의 캐리어 개발

기존의 CaP의 캐리어로서의 기능을 향상시키기 위한 연구에서 젤라틴을 코팅하는 방법은 캐리어의 구조나 두께를 변화시키지 않으면서 압축 강도를 향상시켜 기계적 강도를 증가시키는 한편, 세포의 분화 및 증식을 향상시키는 결과를 보여주었다. 다양한 크기의 기공은 또한 세포의 분화를 촉진시킨다. 캐리어의 구조적 안정성을 강화시키고 생물학적 친화성을 증진시키기 위해 젤라틴이 효과적인 물질임을 확인할 수 있었다.

다양한 성장인자들의 이동 통로로서 약물 및 성장인자

를 서서히 방출시키기 위한 hollow HA spherical granules은 powder/liquid 비율에 따라 SBF의 투과 속도가 달라지는 결과가 나타났다. 이는 hollow granule 내부에 CaP의 다른 전파 속도 때문인 것으로 보이며 약물 방출 속도 조절에 의해 효과적인 경조직 재생을 위한 재료로 사용될 수 있을 것으로 보인다.

CPPGs의 기공 크기는 신생골 형성에서 핵심적인 요소이며 다양한 크기의 paraffin beads를 이용해 조절될 수 있다. 입자형 이식재에서 기공 사이의 상호 연결을 통해 결손부 수복이 이루어지므로 기공 구조 자체도 골 형성을 촉진시키며 기공의 크기가 증가할수록 세포 분화도 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 기공 구조를 형성하고 기공의 크기를 조절하는 방법 또한 골 재생을 촉진시키는 방법이다.

2. 다양한 골 이식재의 골 재생능 평가

자가골 이식재의 적용 한계성으로 인해 임상 적용을 위한 다양한 골 이식재의 골 재생능 평가에서 이종골인 BB와 합성골인 HA는 공통적으로 느리게 흡수되며 부피 유지능이 우수한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 느린 흡수로 인해 이식재가 신생골로 대체되지 못해 신생골 형성에는 제한점이 있었다. 동종골인 DBM gel은 골 형성 단백질(BMP)이 주위 간엽조직세포의 조골세포로의 분화 유도에 의한 골 유도성 재생의 개념에서 시작된 이식재로서 2주에서 8주간 이식재의 흡수가 두드러지게 관찰되었다. 젤형태 이식재의 빠른 흡수는 조직 재생에서 필수적인 재혈관화와 비슷하게 일어나는 장점이 있지만 조직의 형태와 부피를 유지하지 못해 이를 보완할 수 있는 재료와 조합하여 사용하는 것이 필요할 것이다.

다양한 합성골 CaP 중 HA, β -TCP 및 이 둘로 구성된 BCP의 골 재생능 평가에서 신생골 형성은 BCP에서 가장 우수하였으며 이는 잔존 이식재의 양이 적은 결과에서 보듯 이식 후의 BCP의 생체 내 활성이 뛰어나 이식된 후

흡수가 빠른 결과와 상통한다^{23,24}. β -TCP의 적용과 함께 갈슘 침착이 잘 되어 신생골 형성이 촉진되는 것으로 보고된다²⁵. 신생골은 이식재의 외부에 주로 형성되었고 이것은 재료가 흡수된 이후에도 이식 부위의 부피 안정성을 주었다. BCP는 골 재생능과 부피 안정성이 뛰어난 재료로서 HA/ β -TCP의 비율에 따른 생체 활성도 및 흡수도, 골 재생 평가가 필요하다. 골 재생을 위한 최적의 비율은 HA/ β -TCP=60/40이 적합한 것으로 여러 동물 실험 결과에 보고되고 있지만^{26,27} 아직 명확하게 규정된 바는 없다. 이에 따라 골 전도능 향상 효과를 알아보기 위해 HA/ β -TCP=20/80군과의 비교 평가에서 조성비에 따라 흡수 속도는 다소 다를 수 있으나 실험 결과 흡수도 및 신생골 형성량은 크게 차이 없는 것으로 관찰되었다. 이식재와 골 사이의 계면에서 형성된 신생골은 높은 생체 활성을 가진 BCP가 효과적으로 흡수되어 신생골로 대체되었음을 보여준다. BCP의 골 전도능뿐만 아니라 골 유도능에 대해서도 보고된 바가 있는데 *Escherichia coli*-derived recombinant human bone morphogenic protein-2 코팅 시 캐리어로서 골 재생을 촉진시킨다는 결과가 보고된 바 있어²⁸ 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

광범위하게 파괴된 치주조직에서의 골 재생능을 평가하기 위한 1벽성 골 결손부에 nano-particle hydroxyapatite 블록골을 이식한 실험에서 블록 형태의 골 이식재가 높은 안정성과 부피 유지능을 가지는 것이 관찰되었다. 입자형 이식재는 신생골로의 대체는 빠르나 입자가 쉽게 분산되어 결합 조직으로 이동하고, 상피세포의 근단층 이동을 막지 못하여 광범위 결손부에서의 골 재생능이 효과적이지 않음이 보고된 바 있다²⁹. 반면 블록 형태의 이식재는 흡수 속도가 느려 신생골 형성은 입자형보다 적었으나 이식재가 결손부에서 이동 없이 위치하여 입자들이 분산되지 않고 염증반응이 최소화되며 상피세포의 근단층 이동을 방지하였다. BHC 블록골 이식 실험

에서도 유사한 결과를 볼 수 있었는데 이식재의 위치 및 부피가 잘 유지된 군에서는 골 재생이 우수하였으나 콜라겐이 분해된 후 응축되지 못한 bovine HA 블록형 이식재가 분산된 군에서는 골 재생 효과가 낮았다. 따라서 골 이식재는 신생골 형성능 자체의 우수성뿐만 아니라 골 결손부의 형태에 따른 이식재의 형태적 적합성 및 안정성이 고려되어야 할 것이다. 이를 위해 응축된 블록 형태의 골이식재 또는 차단막이 사용될 수 있다. Lee 등³⁰의 논문에서는 콜라겐 차폐막을 사용하는 경우 혈관화가 유도되어 골 재생이 촉진되고 이식재의 구조적 안정성이 유지되어 주변 연조직을 차단하는 결과를 보고하였다. 흡수성 차폐막의 경우 강도가 떨어질 수 있어 골 이식재와의 병용이 추천된다.

V 결론

본 연구에서는 다양한 골 이식재 및 캐리어에 대한 연구를 통해 골 재생능 향상에 대해 알아보고 다음과 같은 결론을 내렸다.

1. 젤라틴 코팅은 캐리어의 생물학적, 기계적 성질을 향상시키고, 캐리어 입자 내부에 기공을 형성하고 그 크기를 조절하는 것을 통해 세포 분화를 조절하여 결과적으로 골 재생을 촉진할 수 있다.
2. 다양한 이식재를 적용하는 것이 골 재생을 촉진할 수 있으며 DBM gel, BB, HA는 신생골 형성은 비슷하나 DBM gel은 흡수도가 높아 부피 유지에 한계가 있다.
3. BCP는 HA/ β -TCP 조성비에 따른 현저한 차이 없이 신생골 형성과 부피 유지에 있어 우수한 골 이식재이다.
4. 1벽성 골결손부와 같은 광범위 결손부에서는 블록 형태의 골이식재 및 차단막의 사용을 통한 이식재의 안정성 및 부피 유지가 요구된다.

이상의 결과를 토대로 추가적인 연구를 진행하여 이상적인 골조직 재생을 위한 다양한 시도가 필요할 것이다.



References

1. Wang HL, Greenwell H, Fiorellini J, et al; Research, Science and Therapy Committee. Periodontal regeneration. J Periodontol. 2005; 76: 1601-1622.
2. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Clinical periodontology and implant dentistry. 3rd ed. Copenhagen: Munksgaard; 1997.
3. Hoexter DL. Bone regeneration graft materials. J Oral Implantol. 2002; 28: 290-294.
4. Yang C, Unursaikhan O, Lee JS, et al. Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2014; 102: 80-88.
5. Sukumar S, Drizhal I. Bone grafts in periodontal therapy. Acta Medica (Hradec Kralove). 2008; 51: 203-207.
6. Wu X, Liu Y, Li X, et al. Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method. Acta Biomater. 2010; 6: 1167-1177.
7. Liu C, Xia Z, Czernuszka JT. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. Chem Eng Res Des. 2007; 85: 1051-1064.
8. Guarino V, Causa F, Ambrosio L. Bioactive scaffolds for bone and ligament tissue. Expert Rev Med Devices. 2007; 4: 405-418.
9. Zhang ML, Unursaikhan O, Yang C, et al. Comparative study of bone regeneration in rabbit calvarial defect following implantation with demineralized bone matrix gel, bovine bone, synthetic hydroxyapatite. Biomater Res. 2012; 16: 140-146.
10. Hwang JW, Part JS, Lee JS, et al. Comparative evaluation of three calcium phosphate synthetic block bone graft materials for bone regeneration in rabbit calvaria. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2012; 100: 2044-2052.
11. Kim SM, Yi SA, Choi SH, et al. Gelatin-layered and multi-sized porous β -tricalcium phosphate for tissue engineering scaffold. Nanoscale Res Lett. 2012; 7: 78.
12. Hong MH, Kim KM, Choi SH, et al. Fabrication of hollow hydroxyapatite spherical granules for hard tissue regeneration and alternative method for drug release test. Micro Nano Lett. 2012; 7: 634-636.
13. Hong MH, Kim SM, Kim KM, et al. Development and in vitro assays of porous calcium polyphosphate granules. Ceram Int. 2013; 39: 4991-4997.
14. Lee JS, Park WY, Cha JK, et al. Periodontal tissue reaction to customized nano-hydroxyapatite block scaffold in one-wall intrabony defect: a histologic study in dogs. J Periodontal Implant Sci. 2012; 42: 50-58.
15. Jung UW, Lee JS, Park WY, et al. Periodontal regenerative effect of a bovine hydroxyapatite/collagen block in one-wall intrabony defects in dogs: a histometric analysis. J Periodontal Implant Sci. 2011; 41: 285-292.
16. Ribeiro CC, Barrias CC, Barbosa MA. Preparation and characterisation of calcium-phosphate porous microspheres with a uniform size for biomedical applications. J Mater Sci Mater Med. 2006; 17: 455-463.
17. Haddad AJ, Peel SA, Clokie CM, et al. Closure of rabbit calvarial critical-sized defects using protective composite allogeneic and alloplastic bone substitutes. J Craniofac Surg. 2006; 17: 926-934.
18. Becker W, Becker BE, Caffesse R. A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. J Periodontol. 1994; 65: 1128-1133.
19. Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. Eur J Endocrinol. 2000; 142: 9-21.
20. Pinholt EM, Bang G, Haanaes HR. Alveolar ridge augmentation in rats by Bio-Oss. Scand J Dent Res. 1991; 99: 154-161.
21. Yukna RA, Harrison BG, Caudill RF, et al. Evaluation of durapatite ceramic as an alloplastic implant in periodontal osseous defects. II. Twelve month reentry results. J Periodontol. 1985; 56: 540-547.
22. Caton J, Nyman S, Zander H. Histometric evaluation of periodontal surgery. II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. J Clin Periodontol. 1980; 7: 224-231.
23. Nery EB, LeGeros RZ, Lynch KL, et al. Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/beta TCP in periodontal osseous defects. J Periodontol. 1992; 63: 729-735.
24. Ramay HR, Zhang M. Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering. Biomaterials. 2004; 25: 5171-5180.
25. Manjubala I, Sivakumar M, Sureshkumar RV, et al. Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. J Biomed Mater Res. 2002; 63: 200-208.

26. Daculsi G, Passuti N, Martin S, et al. Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study. *J Biomed Mater Res.* 1990; 24: 379-396.
27. Ellinger RF, Nery EB, Lynch KL. Histological assessment of periodontal osseous defects following implantation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1986; 6: 22-33.
28. Choi Y, Yun JH, Kim CS, et al. Sinus augmentation using absorbable collagen sponge loaded with *Escherichia coli*-expressed recombinant human bone morphogenetic protein 2 in a standardized rabbit sinus model: a radiographic and histologic analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23: 682-689.
29. Lee JS, Wikesjö UM, Jung UW, et al. Periodontal wound healing/regeneration following implantation of recombinant human growth/differentiation factor-5 in a beta-tricalcium phosphate carrier into one-wall intrabony defects in dogs. *J Clin Periodontol.* 2010; 37: 382-389.
30. Lee EU, Yang CI, Hwang JW, et al. Early healing processes in guided bone regeneration using cross-linked type-i collagen membrane at rabbit calvarial defect. *Biomaterials Research.* 2012; 16: 122-128.